



TITLE:

STUDIES ON THE MOLD ACYLASE(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Doi, Etsushiro

CITATION:

Doi, Etsushiro. STUDIES ON THE MOLD ACYLASE. 京都大学, 1963, 農学博士

ISSUE DATE:

1963-06-25

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/211111>

RIGHT:

氏 名	土 井 悦 四 郎 ど い えつ し ろう
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2 号
学位授与の日付	昭 和 38 年 6 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	STUDIES ON THE MOLD ACYLASE (糸状菌のアシラーゼに関する研究)

(主 査)
論文調査委員 教授 秦 忠 夫 教授 満田久輝 教授 緒方浩一

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は糸状菌の生産する酵素の一種であるアシラーゼについて研究したもので9章にまとめられている。

第1章は緒論であって、本酵素に関する従来の研究および本研究の目的と意義についてのべている。アシラーゼはN-アシルアミノ酸のL-型にのみ作用してL-アミノ酸を分離させる酵素であり、特に金属イオンにより活性化される性質を研究することは、基質特異性の類似するカルボキシペプチダーゼと比較して興味があり、かついわゆる含金属タンパク分解酵素の作用機作を解明するモデルとしても意義深い問題である。

第2章では、酵素の調製法についてのべている。*Aspergillus* 属のなかからより強い酵素活性を有する菌株をさがし、そのふすま培養の水抽出液から出発するのであるが、特に大量の粗抽出液から酵素を収量よく、かつ能率的に精製するカルシウム沈殿法を考案した。

第3章では、糸状菌アシラーゼの一般的性質についてのべている。特に本酵素の金属酵素としての性質に重点を置き、最高活性の発現に必要なコバルトイオン濃度における最適pH、Michaelis恒数を求め、さらにSH-抑制剤、キレート剤、ならびに種々の2価金属イオンの影響などについてしらべ、本酵素の特質が明らかにされている。

第4章では、酵素の安定性についてのべている。本酵素は精製の過程が進むにつれて、その安定性が減少し、ある程度以上の精製は困難であったが、その安定化に寄与する物質について種々検索した結果、酢酸および硫酸イオンが効果のあることを見出し、さらにその効果がEDTAの共存により消失し、コバルトイオンの共存により増加することを知った。ただしコバルトイオン単独の存在は、かえって安定性を減少させる。特に酢酸イオンとコバルトイオンの両者が同時に存在するとき最も安定となることを明らかにし、これによって以後の精製を容易にすることができた。

第5章では、酵素のより高純度への精製についてのべている。すなわち DEAE-Sephadex カラムクロ

マトグラフ法という最も新しい技法によって、従来取除くことのできなかった着色不純物質を完全に除去することができ、さらに引続きアセトン分別を行なって比活度を最初の1,500倍に高めた標品を得ている。これについて電気泳動法および超遠心分離法による分析を行なって、均一なタンパク質であることを明らかにしている。

第6章では、基質あるいは生成物と構造のよく似たカルボン酸による阻害の機作について、カルボキシンペプチダーゼにおける場合と比較した結果についてのべ、特にモノカルボン酸による阻害度はその構造によって著しく異なり、フェニールプロピオン酸が強い阻害を示し、かつその阻害形式が非拮抗的であることを明らかにしている。

第7章と第8章では、金属イオンと酵素作用の関係について詳細に検討した結果についてのべている。すなわち、まず種々のアシルアミノ酸を基質とした場合についてコバルトイオンによる活性化の割合を比較して、その活性化割合が基質の種類によって著しく異なることを明らかにした。たとえばアセチルロイシンの分解速度はコバルトイオンによって約5倍に増加するが、クロロアセチルフェニルアラニンのそれは逆に減少することを知り、コバルトイオンの添加が酵素作用発現のためには必須ではなく、酵素には本来強固に結合している何らかの金属イオンが存在することを推定した。これについて、酵素タンパクにコバルトイオンまたはEDTAを添加したのち透析処理あるいはSephadex処理を行なって確認した。

さらに厳密な注意を払った実験条件において、1,10-フェナントロリンを用いる透析処理によって完全に金属をもたない酵素を調製し得た。これに種々の2価金属イオンを加えて金属酵素を再合成し、その基質特異性をしらべた結果、亜鉛イオンを加えた場合が、もともとの酵素のそれとよく一致し、本来強固に結合して存在した金属は亜鉛であるとの結論を得た。

第9章は総括である。

論文審査の結果の要旨

アシラーゼはN-アシルアミノ酸のL-型にのみ作用してL-アミノ酸を分離させる酵素であり、広く生体内に分布して存在し、その性質は、合成ラセミアミノ酸の光学分割に利用され実用的意義をも有するものである。アシラーゼに関する研究は数多く見られるけれども、糸状菌のそれについては高純度の精製酵素を用いての研究はすくない。また特に本酵素を金属酵素としての立場から検討した研究はほとんど見られない。

本論文の著者はアシラーゼを強力に生産する糸状菌を検索し、そのふすま培養の抽出液から本酵素を能率よく、選択的に沈殿させるカルシウム沈殿法を考案し、多量の粗酵素を得て、さらに、酵素の安定性を詳しく検討し、DEAE-Sephadexを用いるカラムクロマトグラフ法を適用するなどの努力を重ねて、比活度がもとの1500倍に達する純粋標品を得ることに成功した。とりわけ本著者の考案したカルシウム沈殿法は、この種の酵素の工業的生産に適し、高い実用的意義をもつものといえる。

著者は精製酵素標品を用いて、特に金属酵素としての見地から、酵素的諸性質を研究し、その特質を明らかにしている。

さらに、著者は従来から知られていたコバルトによる酵素の活性化現象について、種々の合成基質を用

いて、いろいろな条件で検討を加えた結果、コバルトによる活性化割合が基質の種類により著しく異なることを見出した。

たとえばアセチルロイシンの分解速度はコバルトによって約5倍に増加するが、クロロアセチルフエニルアラニンのそれは逆に減少することから、コバルトの添加は酵素作用そのもののためには必ずしも必要ではなく、酵素には別な金属が存在するものと考えた。そして厳密な注意のもとに、金属を全然含まない酵素をつくり、それにあらためて種々の2価金属イオンを加えて再合成してその基質特異性を検討した結果、本来強固に結合して存在する金属層は亜鉛であると結論した。

このような知見はカルボキシペプチダーゼにおいてすでに認められているが、アンラーゼについては本論文が始めてであり、含金属タンパク分解酵素の作用機作の解明に重大な手がかりを与えるものであって生化学に貢献するところ大である。

よって本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。